

Plattformchemikalien aus Silage

Prof. Dr. Roland Ulber

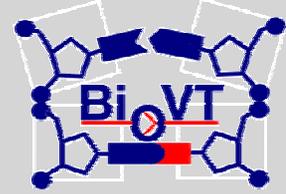
Technische Universität Kaiserslautern
FB Maschinenbau und Verfahrenstechnik
Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik



Wer uns findet,
findet uns gut!



Der nachwachsende Rohstoff Gras



- Ca. 600.000 ha werden in Deutschland für Produktion von Gras genutzt¹
- Ertrag: ca. 150.000.000 t Grünmasse²
- Gras enthält viele biotechnologisch nutzbare Substanzen
- Nachteile bei der industriellen Nutzung:
 - Schneller Verderb während der Lagerung
 - Verfügbarkeit auf die Wachstumsperiode (Mai bis Oktober) beschränkt



¹ Statistisches Bundesamt, Bodennutzung 2008

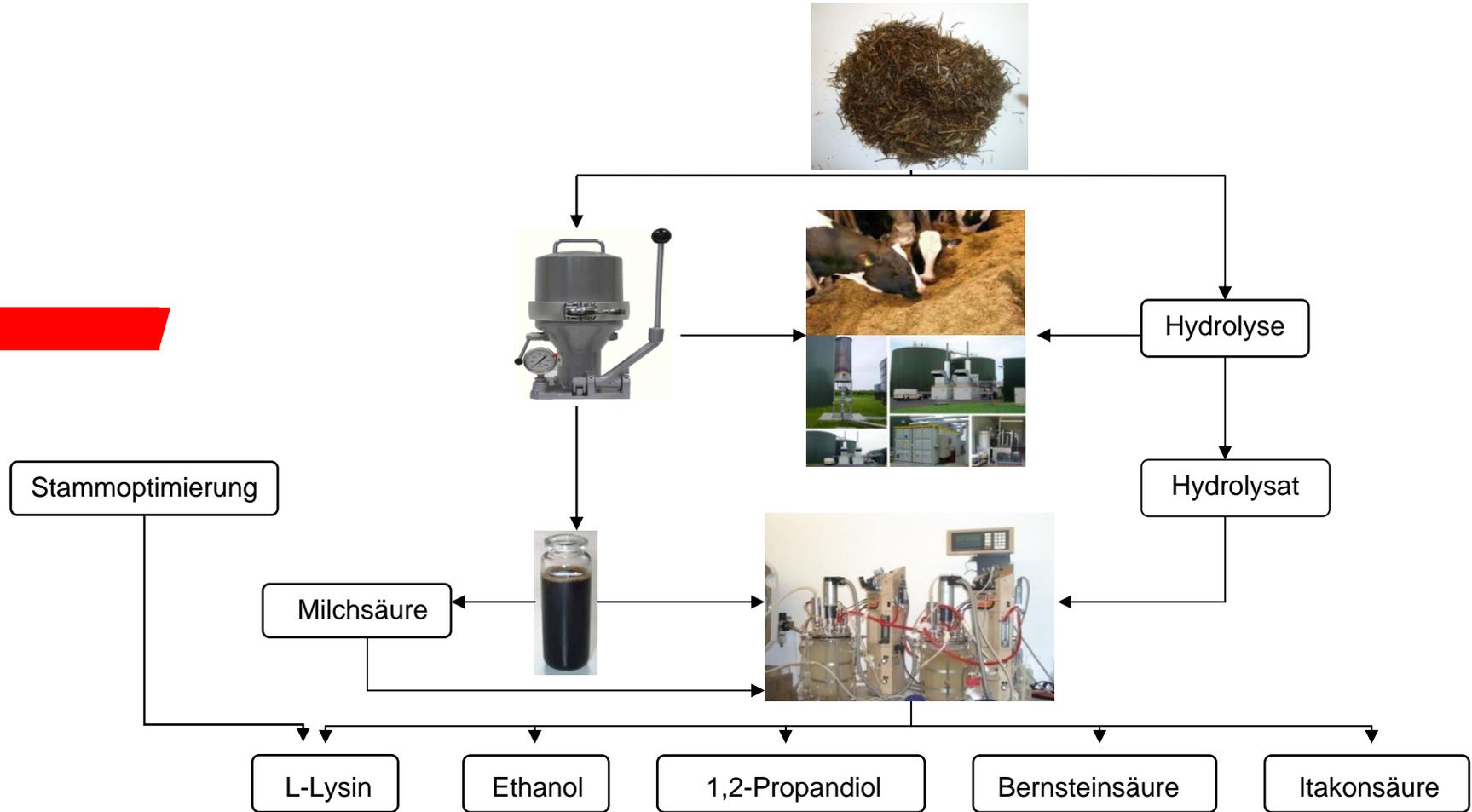
² Statistisches Bundesamt, Bodennutzung 2008

- Traditionelle landwirtschaftliche Technik
- Grasschnitt wird in Silos oder Ballen gepresst
- Anaerobes Wachstum von *Lactobacilli*
- Ansäuerung und anaerobe Bedingungen bewirken Konservierung
- Produktion wertvoller Produkte wie organischer Säuren
- Andere Pflanzenbestandteile, wie Zucker und Aminosäuren, werden freigesetzt



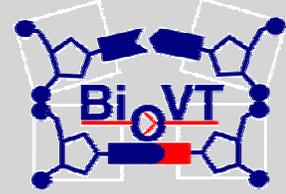
- Grundfutter für Pferde und Kühe
- Biogasherstellung
- Isolierung werthaltiger Komponenten (Milchsäure und AS)
- Ziel dieser Arbeit: Nutzung von Silage als nachwachsenden Rohstoff für die Produktion von Grund- und Feinchemikalien





- Vermutung: Silierung bewirkt verbesserte Hydrolysierbarkeit => keine Vorbehandlung notwendig
- Enzymatische Hydrolyse mit Enzymen von Novozymes
- pH 4 in Citronensäure-Phosphatpuffer
- Hydrolyse ohne zusätzliche Vorbehandlung erbrachte 1,2 g/L Glukose im Hydrolysat
- Ausbeute: 0,03 g Glukose / g TM
- => Vorbehandlung erforderlich





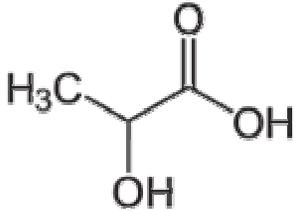
- Beste Vorbehandlung: alkalisches Peroxid
- 2 % H₂O₂ in Wasser, pH 11, 50 °C, 24 h
- Silagekonzentration:
 - Beste Ausbeute: 40 g/L Silage
 - Höchste Konzentration im Hydrolysat: 120 g/L
- Eingesetzte Enzymmenge:
 - Celluclast 1.5L: 160 µL/g TM,
 - Novozyme 188: 16 µL/g TM
 - Shearzyme 500L: 53,3 µL/g TM
- pH 4, 50 °C, 24 h

Silagekonzentration	40 g/L	120 g/L
Glukoseausbeute	0,198 g/g	0,09 g/g
Glukosekonzentration	7,9 g/L	10,7 g/L
Zuckerausbeute	0,323 g/g	0,212 g/g
Zuckerkonzentration	12,9 g/L	25,4 g/L

- Zusammensetzung unabhängig von Pressbedingungen ab 100 bar
- 1 kg Silage (FM) liefert 270 mL Presssaft

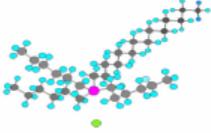
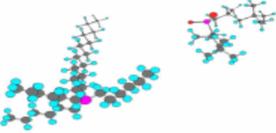
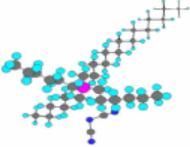
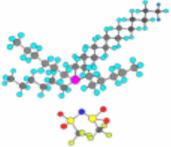
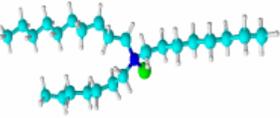
	Konzentration [g/L]
Glukose	20
Milchsäure	80
Ethanol	4
TM	390



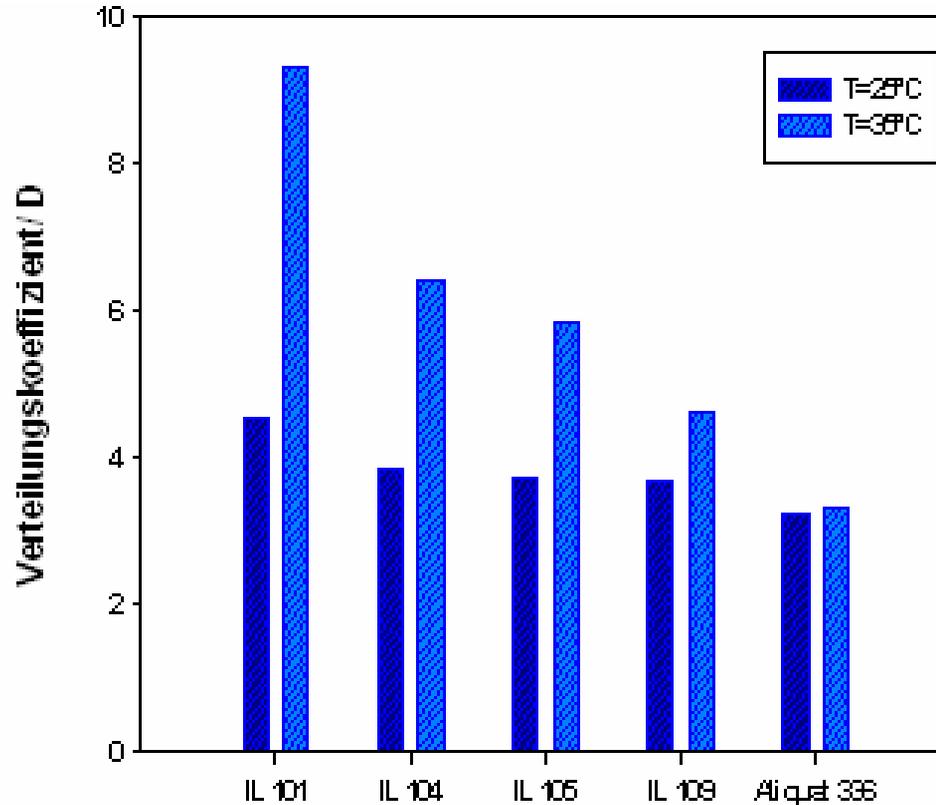


- Milchsäure stellt einen wichtigen *Building Block* für die Produktion biobasierter Kunststoffe (z.B. PLA) dar
- Presssaft enthält ca. 80 g/L Milchsäure => Gewinnung der Milchsäure aus Silage wirtschaftlich interessant
- Isolierung der Milchsäure aus Silagepresssaft erfolgt mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ionischen Flüssigkeiten



Strukturformel	Name
	<p>IL 101: Tetradecyl (trihexyl) phosphoniumchlorid</p>
	<p>IL 104: Trihexyl (tetradecyl)phosphonium bis 2,4,4-trimethylpentylphosphinat</p>
	<p>IL 105: Tetradecyl (trihexyl) phosphoniumdicianamid</p>
	<p>IL109: Tetradecyl(trihexyl) phosphoniumbistriflamid</p>
	<p>Aliquat 336 Tricaprylmethylammonium chlorid</p>

- Bei einigen Ionischen Flüssigkeiten großer Einfluss der Temperatur auf die Extraktion



➤ Extraktion

- T=25°C
- T=35°C

➤ Wäss. Phase-

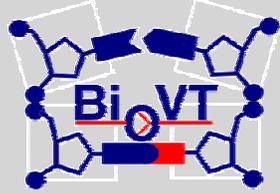
➤ Silagesaft

- pH-Wert 5
- C in ,MS = 60 g/l

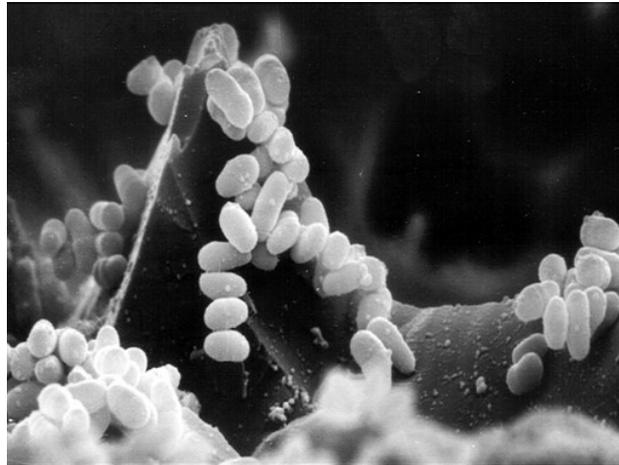
➤ Organische Phase

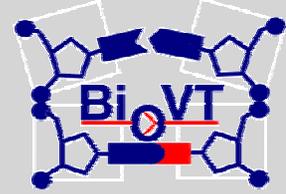
- 0,724 M Cyphos IL in I-Decanol
- Org.Ph./Wäss.Ph./1:1

L-Lysin-Produktion



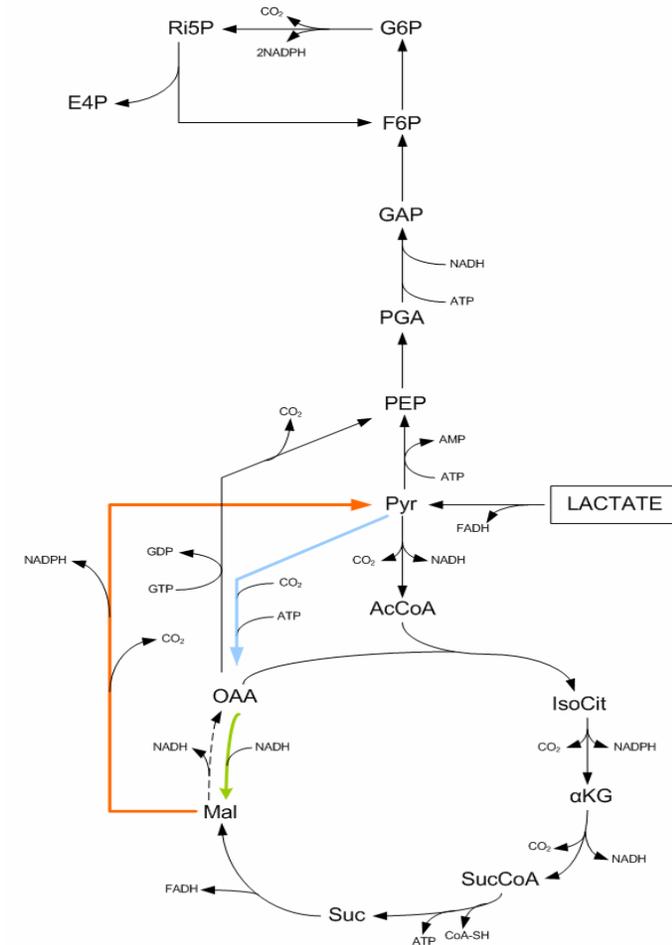
- Fermentation von *Corynebacterium glutamicum* auf Silagepresssaft
- GRAM-positiv, hoher G+C-Gehalt, GRAS-Status
- Einer der wichtigsten biotechnologischen Produktionsorganismen, ca. 2 Mio t Aminosäuren/Jahr
- Seit 2003 ist das gesamte Genom bekannt => Modellorganismus für Systembiologie

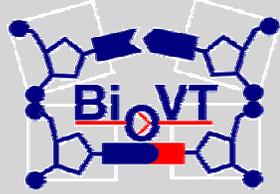




- *C. glutamicum* kann auf D- und L-Laktat als einziger C- und Energiequelle wachsen
- 2 Gene benötigt:
 - D-Laktat-Dehydrogenase: konstitutiv exprimiert, geringe Expressionsrate
 - L-Laktat-Dehydrogenase: induzierbar
- Kofaktor der Laktatdehydrogenase: NADH
- Lysinproduktion benötigt 4 mol NADPH / mol Lysin
- => NADPH-Synthese in der Glukoneogenese ist von großem Interesse
- *C. glutamicum* muss seinen Stoffwechsel umstellen und bei Wachstum auf Milchsäure andere NADPH-Quellen aktivieren können

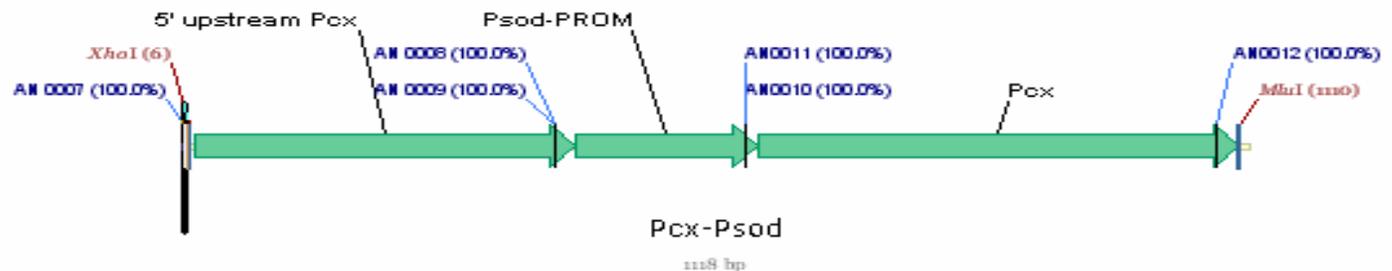
- Bei niedrigen Wachstumsraten: Isocitrat-Dehydrogenase
- Bei höheren Wachstumsraten: **Pyruvat-Carboxylierung zu OAA**, dann **Reduktion zu Malat** durch die **Malatdehydrogenase**, **Decarboxylierung zu Pyruvat**
- Generiert zusätzliches NADPH ohne Kohlenstoffverlust
- Exponentielles Wachstum ist von der Konzentration der Malatdehydrogenase abhängig



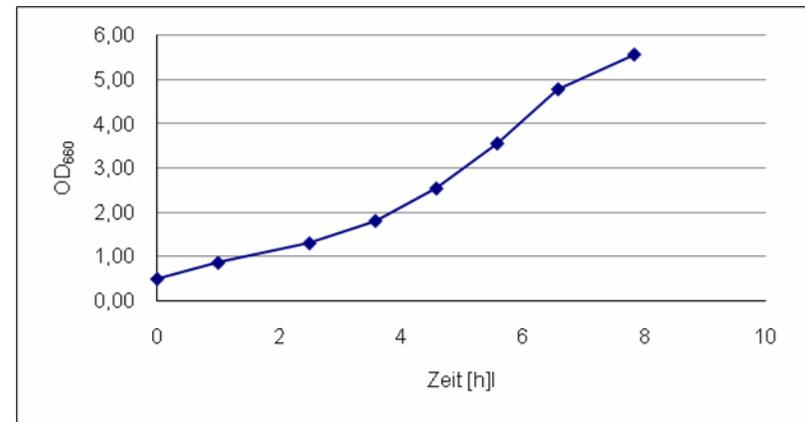
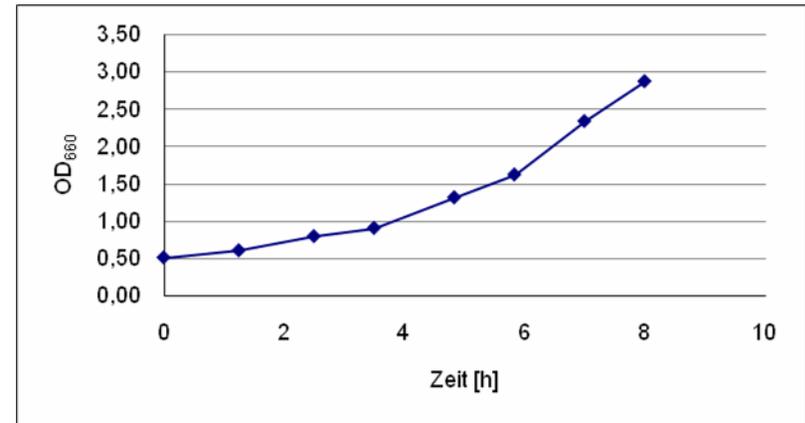


- Vorgehensweise:
- Verbesserung des Wachstums auf D- und L-Laktat
- Verbesserung von Wachstum und L-Lysin Produktion auf simulierten Presssäften
- Identifikation potentieller Ziele für weitere Stammverbesserungen

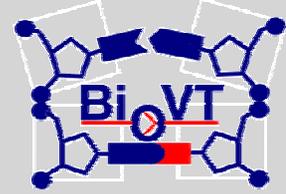
- Verbesserung der Expression von D-Laktatdehydrogenase und Pyruvatcarboxylase: Austausch des natürlichen Promotors gegen den stärkeren Psod-Promotor
- Integration der Modifikation ins Genom



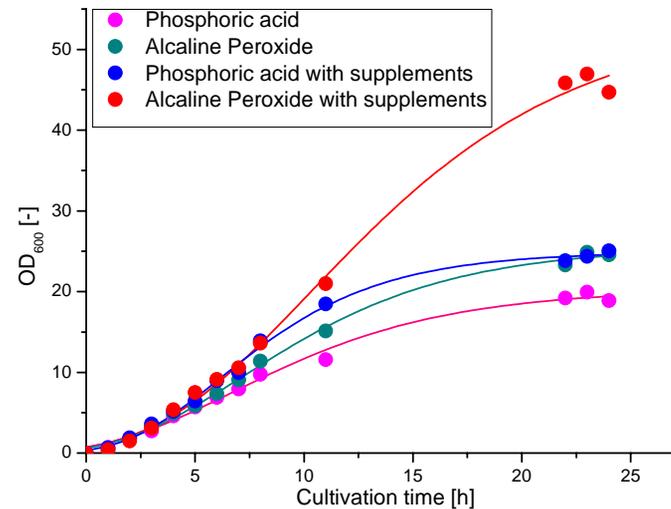
- LysC auf Minimalmedium mit Laktat als einziger C- und Energiequelle, $\mu_{\max}=0,244 \text{ h}^{-1}$
- Verbesserter Stamm LysC-dId-Psod auf Minimalmedium mit Laktat als einziger C- und Energiequelle, $\mu_{\max}=0,341 \text{ h}^{-1}$



Fermentation auf Silage-Hydrolysaten

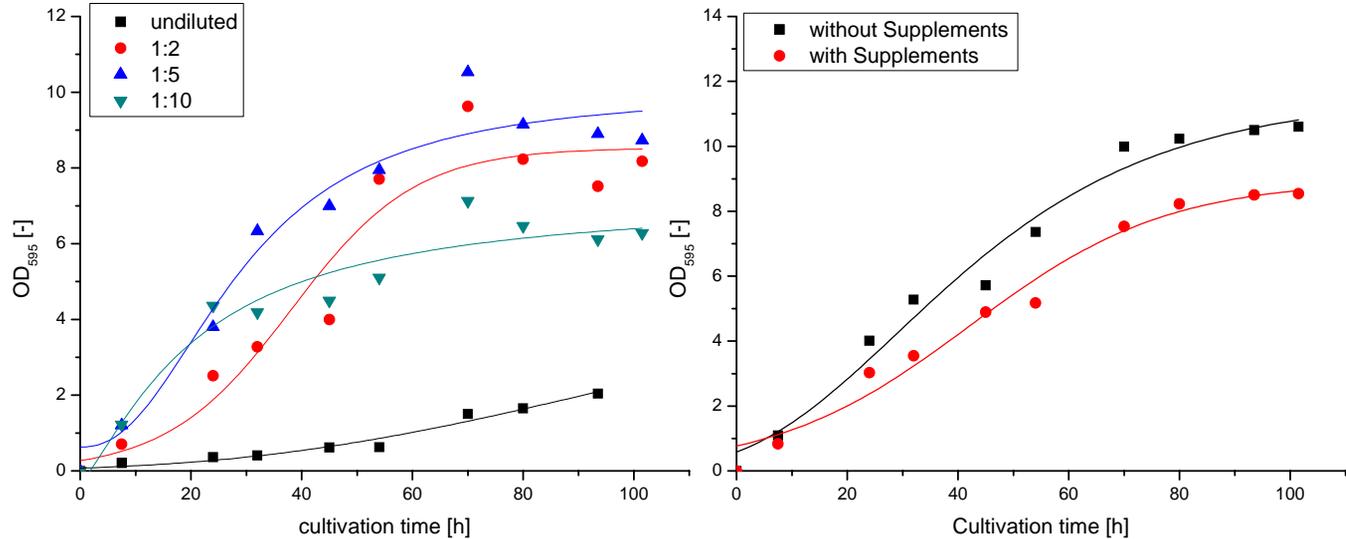


- Fermentierbarkeit der Hydrolysate durch Co-Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* und *Pachysolen tannophilus* getestet



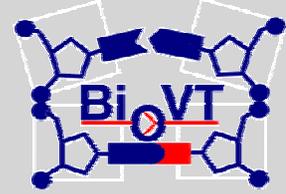
- Die Hydrolysate mit den besten Ausbeuten und Konzentrationen sind nutzbar
- Supplementierung mit Vitaminen, Spurenelementen und Stickstoffquelle notwendig

- Getestet durch Co-Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* und *Pachysolen tannophilus*

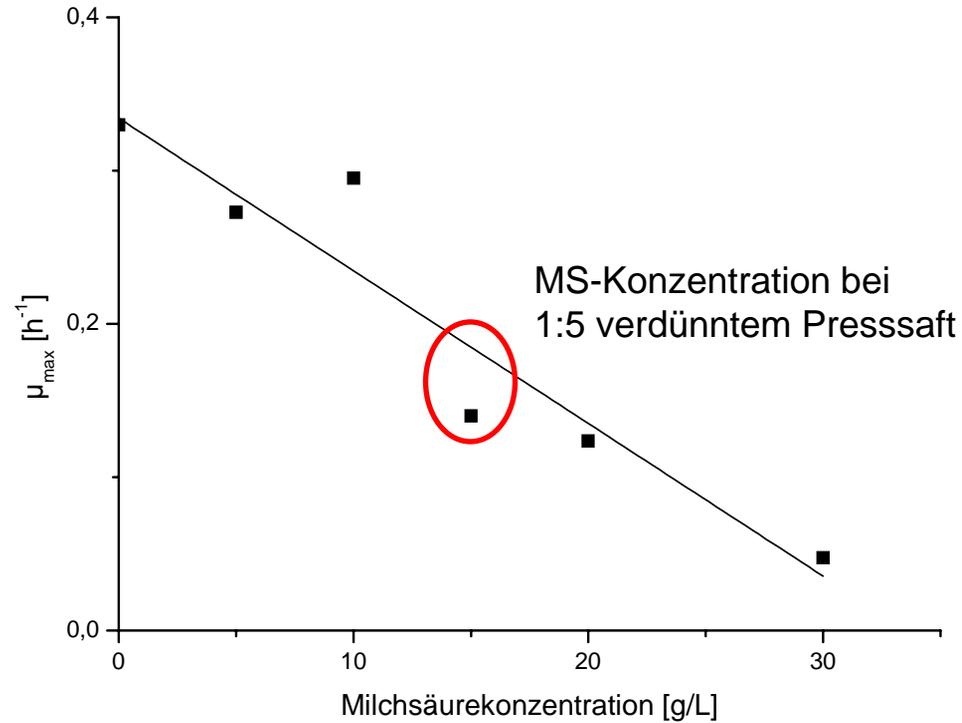


- Presssaft muss verdünnt werden
- Keine Supplementierung notwendig

Fermentation auf Silage- presssaft



- Sehr geringes μ_{\max} bereits bei 30 g_{Milchsäure}/L
Milchsäurekonzentration im Presssaft: 80 g/L

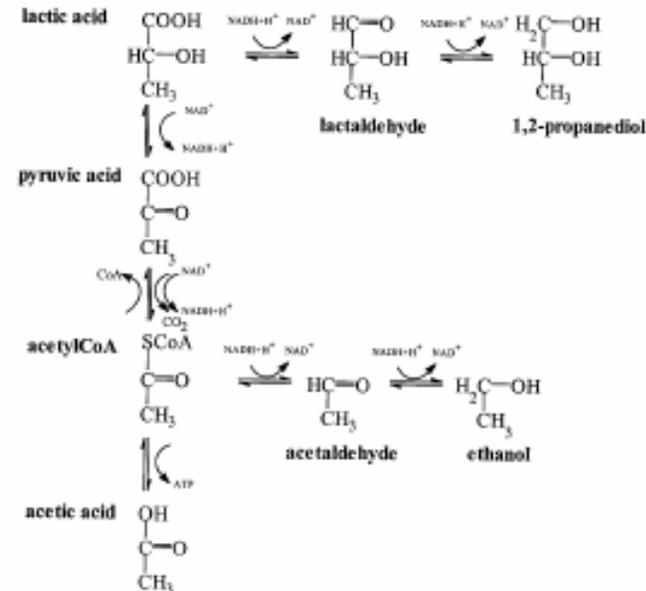
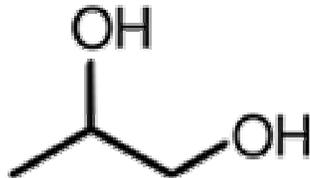


- 1 kg Silage (TM) liefert 540 mL Presssaft, aber 25 L fermentierbares Hydrolysat (bei 40 g/L Silage)

Medium	Ausbeute [$\text{g}_{\text{Ethanol}} / \text{kg}_{\text{Silage TM}}$]
Verdünnter Presssaft (1:5)	11,3
Presssaft Fed-Batch	14,4
Hydrolysat, 40 g/L Silage	52,5
Hydrolysat, 120 g/L Silage	25,8
Verdünnter Presssaft (1:5) + Hydrolysat (120 g/L)	35,9

- => Presssaft erreicht höhere Ethanolkonzentrationen, Ausbeute pro kg Silage aber mit Hydrolysaten besser
- Nachteil der Hydrolysate: benötigen Zusätze
- Lösung: Kombination von Hydrolysat und Presssaft

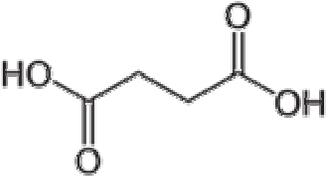
- 1,2-Propandiol
 - Lässt sich fermentativ mit *Lactobacillus buchneri* aus Milchsäure darstellen
 - Nutzbar für Polyester, pharmazeutische Produkte und als Frostschutz



Elfering *et al.* (2001): Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Mikrobiol* **67**, pp 125-132.

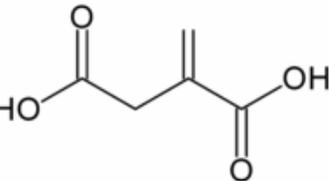
- Bernsteinsäure

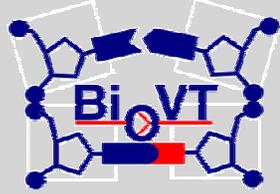
- Petrochemische Spezialchemikalie
- Potentieller wichtiger *Building Block* für biobasierte Wirtschaft
- Nutzbar für
 - Polymere
 - Lösungsmittel
 - Nylon
- Fermentative Herstellung mit *Actinobacillus succinogenes* verbraucht CO_2



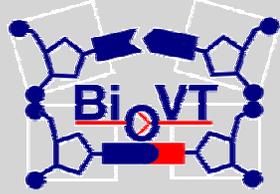
- Itakonsäure

- Potentieller *Building Block*
- Nutzbar als
 - Co-Polymer
 - Farbzusatz
 - Detergenz
 - In Pharmazeutika





- Silage bietet die Möglichkeit, den Rohstoff Gras ganzjährig zur Verfügung zu halten
- Nach Vorbehandlung können fermentierbare Zucker durch enzymatische Hydrolyse aus der Silage gewonnen werden
- Fermentierbarkeit des Presssafts durch hohe Konzentrationen organischer Säuren eingeschränkt
- Herstellung von Ethanol aus Silage wurde gezeigt
- Produktionsstamm wird für L-Lysin-Produktion optimiert
- Milchsäure kann aus dem Silagepresssaft extrahiert werden
- => Produktion unterschiedlicher Grund- und Feinchemikalien aus Silage möglich



- Prozessoptimierung der Ethanolproduktion (Fed-Batch-Prozesse)
- Übertragung auf Fermentationen zu weiteren Grundchemikalien
- Einsatz der genetisch optimierten Stämme auf Realmedien
- Bestimmung der Vergärbarkeit der Restsubstanzen in Biogasprozessen
- Stoffliche und energetische Bilanzierung des Gesamtprozesses (Gewinnung von Milchsäure; Fermentation der Hydrolyse- & Presssaftfraktion; Biogaserzeugung)



AK Heinzle, UdS
Stammoptimierung

AK Bart, TU KL
Milchsäureauf-
arbeitung



Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz



Förderung des Projektes durch das
BMELV über die FNR 2008 – 2011
22025407

...und Ihnen für Ihre Aufmerksamkeit!